

Aktivitas Protease Dari *Bacillus circulans* Pada Media Pertumbuhan Dengan pH Tidak Terkontrol

La Ode Sumarlin

Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
email : Lamarid@yahoo.com

Abstrak

Salah satu enzim yang telah banyak dipelajari adalah enzim protease. Jenis enzim ini merupakan enzim yang penting dari segi ekonomi karena menguasai 59% dari total penjualan enzim di dunia. Aplikasi protease telah meluas, baik pada industri pangan maupun nonpangan. Industri pangan memanfaatkan protease untuk memperbaiki tekstur, mempersingkat waktu pencampuran, dan meningkatkan volume adonan pada pembuatan roti, menjernihkan bir, mengempukkan daging, dan menggumpalkan susu. Enzim ini dapat diproduksi oleh mikroba dalam suatu media mengandung Air Rendaman Kedelai (ARK) dengan pH tidak terkontrol. Pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode Bergmeyer dan Grassl sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode Bradford. Hasil analisis menunjukkan bahwa Aktivitas Protease (AP) pada media Air Rendaman Kedelai dan media standar dengan pH tidak terkontrol masing-masing sebesar 0,1814 U/ml dan 0,0342 U/ml. Produksi protease pada media tersebut optimum pada pH 9,28, jam ke-56 pada fase akhir eksponensial dari fase pertumbuhan mikroba.

Kata Kunci : pH optimum, *Bacillus circulans*, protease, ARK

Abstract

Protease was one of enzymes which had been a lot of studied. This enzyme has an important economical aspect where over then 59% of total selling enzymes in the world was occupied by protease. Application of protease have been extended in food industry as well as of non food industry. In food industrial engineering, protease had been used for repair texture, shorten time interference and increase volume batter at production bread, make bir clear, soften meat and make milk coagulate. This enzyme can be produced by microba in "water soaking soybean" (WSS) with uncontrolled pH. The activity of enzyme had been measured by using Bergmeyer and Grassl methods while the protein content was measured by Bradford method. The activity of protease (AP) in WSS and standard medium with uncontrolled pH where found to be 0,1814 U/ml and 0,0342 U/ml respectively. The production of protease at the above mentioned medium was achieved optimum at pH 9.28, and 56th hours in the end of logarithmic phase of microba.

Keywords : *Bacillus circulans*, protease, WSS

1. PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu bioteknologi telah menempatkan penggunaan enzim sebagai salah satu alternatif untuk berbagai keperluan misalnya di bidang industri, pengobatan, dan analisis. Keuntungan penggunaan enzim antara lain : (1) enzim merupakan bahan alami yang tidak beracun, (2) enzim dapat mempercepat reaksi tanpa menyebabkan terbentuknya hasil reaksi yang tidak diinginkan, (3) enzim aktif

pada konsentrasi rendah, (4) kecepatan reaksi enzim dapat diatur dengan mengatur suhu, pH, dan jumlah enzim yang digunakan, (5) enzim dapat diinaktifkan jika reaksi yang diinginkan sudah diperoleh, (6) enzim merupakan senyawa alamiah yang ramah lingkungan (Suhartono, 1993). Enzim juga masih mempunyai kemampuan transformasi kimia meskipun telah terpisah dari sel (Bakhtiar, A 1991).

Salah satu enzim yang telah banyak dipelajari adalah enzim protease. Jenis enzim ini merupakan enzim yang penting dari segi ekonomi karena menguasai 59% dari total penjualan enzim di dunia (Suhartono, 1993). Aplikasi protease telah meluas, baik pada industri pangan maupun nonpangan. Industri pangan memanfaatkan protease untuk memperbaiki tekstur, mempersingkat waktu pencampuran, dan meningkatkan volume adonan pada pembuatan roti, menjernihkan bir, mengempukkan daging, dan menggumpalkan susu. Protease pada industri non pangan digunakan antara lain dalam bidang kesehatan, fotografi, industri detergen, dan industri kulit.

Enzim ini dapat dihasilkan oleh tanaman, hewan, dan mikroba. Protease yang dihasilkan oleh mikroba sangat potensial untuk digunakan karena sumbernya yang berlimpah, produksi enzim yang cepat, biaya produksi relatif murah, dan mudah dikontrol.

Enzim mempunyai aktivitas maksimum pada kisaran pH yang disebut pH optimum, yang umumnya antara pH 4,5 sampai 8,0. Suatu enzim tertentu mempunyai kisaran pH yang sempit. Disekitar pH optimum enzim mempunyai stabilitas yang tinggi. Stabilitas enzim terhadap panas berhubungan erat dengan stabilitasnya terhadap pH, sering stabilitas terhadap panas tidak pada pH isoelektrik dari enzim. Bila pH di bawah atau di atas pH optimum, semakin jauh dari pH optimum maka enzim semakin tidak stabil dan semakin tinggi suhu maka stabilitasnya semakin menurun.

Pada penelitian ini telah diidentifikasi mikroba yang memproduksi protease dalam jumlah banyak, yaitu *Bacillus circulans*. Mikroba tersebut diisolasi dalam limbah padat kecap. Pemurnian dilakukan untuk memisahkan enzim tertentu dari ekstrak kasar yang masih mengandung sel mikroba dan komponen lainnya.

Penelitian selanjutnya adalah mempelajari aktivitas protease Air Rendaman Kedelai pada pH yang tidak terkontrol dari *Bacillus circulans*. Melalui penelitian ini diharapkan akan memberikan informasi mengenai pH optimum enzim protease dari *Bacillus circulans*.

2. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Air Rendaman Kedelai (ARK) digunakan sebagai media untuk pertumbuhan mikroba penghasil protease. Bahan penunjang lainnya adalah Natrium hidroksida, buffer borat, kalsium klorida, asam klorida, TCA (*Trichloroacetic Acid*), natrium karbonat, reagen folin ciocalteau, larutan enzim, isolat bakteri (*Bacillus circulans*), *coomassie brilliant blue* G-250, etanol, asam sulfat, *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan ammonium sulfat.

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, pH meter, sentrifusa, spektrofotometer UV-Vis Hitachi, inkubator, dan fermentor.

Produksi Enzim

Isolat bakteri ditumbuhkan pada media agar miring dengan komposisi sebagai berikut : *malt extract* 3 gr, pepton 5 gr, agar 15 gr, dan aquades 1 liter selama 3 hari. Sebanyak 2 ose inokulum dipindahkan ke dalam media cair dan ditumbuhkan selama 1 hari. Produksi enzim dilakukan dalam fermentor (kapasitas 3 liter) dengan volume media satu liter. Penelitian dilakukan dengan perlakuan pH tidak terkontrol. Sebagai pembanding digunakan media dengan komposisi tertentu (media standar) yang mengandung KH_2PO_4 3 gr/l, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15 gr/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 gr/l, NaCl 0,5 gr/l, NH_4Cl 0,1 gr/l, NaNO_3 1 gr/l, glukosa 1 gr/l, kasein 10 gr/l, dan ekstrak khamir 0,5 gr/l. pH media diatur menjadi 10.

Tingkat pertumbuhan dan fluktuasi aktivitas protease (AP) ditetapkan dengan cara pengambilan contoh (sampling) dilakukan setiap 8 jam selama 80 jam. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 620 nm. Kondisi pertumbuhan yang optimal bagi produksi protease dari *B. circulans* akan digunakan untuk produksi enzim pada tahap selanjutnya.

Analisis Kadar Protein Metode Bradford

Sebanyak 0,1 ml larutan enzim ditambahkan ke dalam 5 ml larutan Bradford. Kemudian didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang dan diukur absorbansnya pada panjang gelombang 595 nm dengan spektrofotometer Uv-Vis.

Kurva standar (Konsentrasi BSA vs Absorbans) dibuat menggunakan BSA dengan

konsentrasi 0-100 ppm. Standar diperlakukan seperti sampel, tetapi tanpa menggunakan enzim. Kadar protein sampel (mg/ml)

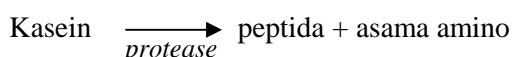
diperoleh dari persamaan regresi kurva standar.

Tabel 1. Metode Analisis aktivitas protease Metode Bergmeyer & Grassl

Pereaksi	Sampel (ml)	Blanko (ml)	Standar (ml)
Bufer Borat 0,2 M pH 8.0	1.00	1.00	1.00
Bufer kasein (2%b/v)	1.00	1.00	1.00
HCl (0,05 M)	0.20	0.20	0.20
Larutan enzim	0.20	-	-
Akuades	-	0.20	-
Tirosin (5 mM)	-	-	0.20
Inkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C			
TCA (0,1 M)	2.00	2.00	2.00
CaCl ₂ (2 mM)	0.20	-	-
Larutan Enzim	-	0.20	0.20
Inkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit			
Supernatan	1.50	1.50	1.50
Na ₂ CO ₃ (0,4 M)	5.00	5.00	5.00
Reagen Folin (1 : 2)	1.00	1.00	1.00
Inkubasi selama 20 menit pada suhu 35°C, kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 578 nm			

Pengukuran aktivitas protease

Pengukuran aktivitas protease ini menggunakan metode Bergmeyer & Grassl 1983. Prinsip kerja dari metode ini yaitu kasein yang berfungsi sebagai substrat akan dihidrolisis oleh protease dengan bantuan air menjadi peptida dan asam amino.



Laju pembentukan peptida dan asam amino tersebut dapat dijadikan tolak ukur aktivitas katalisis protease. Asam-asam amino yang terbentuk harus dipisahkan dari substrat yang tidak terhidrolisis. Umumnya pemisahan ini dilakukan dengan penambahan TCA. Penambahan TCA tersebut menyebabkan produk yang mengandung peptida dan asam amino akan larut dalam TCA, sedangkan protein yang tidak terhidrolisis akan mengendap. Penambahan TCA ini sekaligus menginaktifkan enzim protease. Asam-asam amino tirosin dan triptophan yang larut dalam TCA akan bereaksi dengan reagen folin menghasilkan warna biru. Penambahan Na₂CO₃ bertujuan untuk mendapatkan pH sekitar 11,5 yang merupakan pH optimum untuk intensitas dan stabilitas warna (Novo, 1981). Warna yang terbentuk diukur

absorbansinya pada daerah sinar tampak 578 nm dengan alat spektrofotometer Uv-Vis. Besarnya serapan berbanding lurus dengan konsentrasi protein yang terhidrolisis. Aktivitas protease dihitung berdasarkan persamaan :

$$UA = \frac{A_1 - A_0}{A_s - A_0} \times Px \frac{1}{T}$$

Keterangan :

UA : Unit aktivitas (U/ml/menit)

A₁ : Absorbansi sampel

A₀ : Absorbansi blanko

A_s : Absorbansi standar

T : Lama inkubasi

P : Faktor pengenceran

Secara kuantitatif kemurnian ditentukan berdasarkan aktivitas spesifik (U/mg) yaitu perbandingan antara Unit aktivitas (U/ml) dan kadar protein (mg/ml)

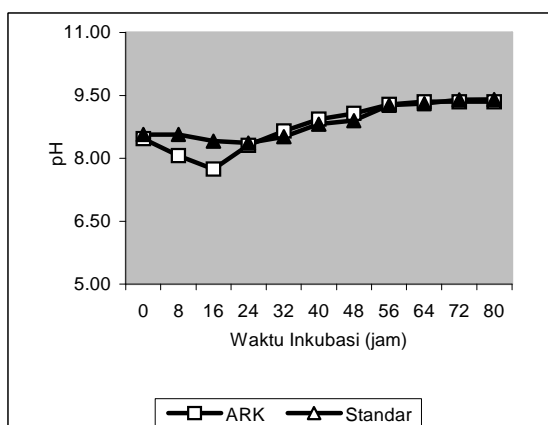
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi enzim

Berdasarkan hasil analisis, Aktivitas Protease (AP) pada media Air Rendaman Kedelai dan media standar dengan pH tidak terkontrol masing-masing sebesar 0,1814 U/ml dan 0,0342 U/ml.

Keadaan ini menunjukkan bahwa media air rendaman kedelai lebih baik daripada media standar untuk menghasilkan protease. Tingginya aktivitas protease tersebut disebabkan kandungan protein yang cukup tinggi pada kedelai sebagai sumber nitrogen bagi mikroorganisme.

Pada awal produksi enzim, pH media cenderung mengalami penurunan karena terjadi proses pemecahan karbohidrat menjadi asam-asam organik. Kemudian mengalami kenaikan yang disebabkan oleh media yang tertutup oleh amoniak yang terbentuk dari pemecahan senyawa-senyawa yang mengandung nitrogen (Gambar 1).



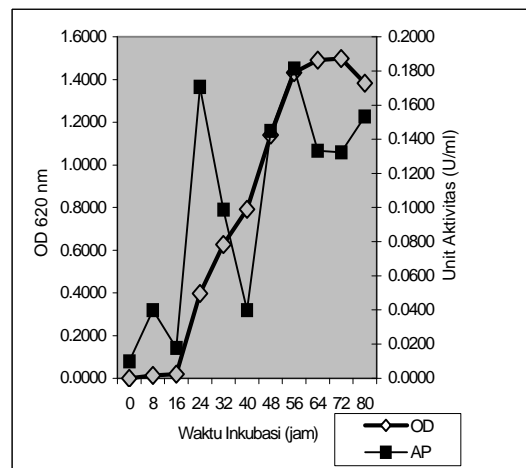
Gambar 1. Nilai pH pada berbagai waktu inkubasi

Hasil analisis pada perlakuan dengan pH media tidak terkontrol pada media air rendaman kedelai menunjukkan aktivitas protease tertinggi pada pH 9,28, jam ke-56 sebesar 0,1814 U/ml. Bila dihubungkan dengan fase pertumbuhan mikroba, maka aktivitas tertinggi tersebut terdapat pada akhir fase eksponensial (Gambar 2).

Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Ward (1983), bahwa pembentukan enzim protease mulai meningkat selama memasuki fase eksponensial, kemudian meningkat dengan cepat memasuki stasioner. Dalam keadaan normal sintesis enzim ekstraseluler maksimum terjadi sebelum fase stasioner atau akhir fase eksponensial menjelang fase stasioner (Schaefer, 1969).

Tingginya produksi enzim pada fase eksponensial ini diduga berhubungan dengan

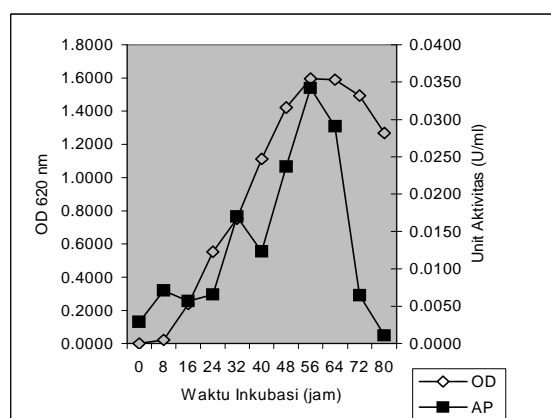
proses sporulasi yang cepat dan mengalami penurunan sejalan dengan menurunnya proses sporulasi. Produksi enzim sejajar dengan kurva pertumbuhan dan mencapai optimal pada akhir fase eksponensial (Kumalaningsih, 1989).



Gambar 2. Aktivitas Protease (AP) dalam media air rendaman kedelai dengan pH tidak terkontrol pada berbagai fase pertumbuhan mikroba (OD)

Penelitian oleh Bernlohr (1964), juga menunjukkan kultur yang mempunyai efisiensi sporulasi yang tinggi akan diimbangi dengan aktivitas protease yang tinggi. Dalam penelitian ini digunakan media standar sebagai pembanding yang ternyata mempunyai kecenderungan yang sama, yaitu aktivitas optimum pada fase eksponensial (Gambar 3).

Umumnya setelah fase stasioner aktivitas enzim menurun. Hal ini disebabkan



Gambar 3. Aktivitas Protease (AP) dalam media standar dengan pH tidak terkontrol pada berbagai fase pertumbuhan mikroba (OD)

oleh adanya hasil-hasil metabolisme yang dapat menghambat aktivitas enzim. Rendahnya

aktivitas enzim dapat disebabkan oleh kadar garam, pH, dan substrat. Di samping itu, penurunan aktivitas berkaitan dengan kegiatan saling menghancurkan di antara protease pada saat substrat sudah mulai berkurang karena protease juga merupakan suatu protein (Suhartono, M.T., 1988).

4. KESIMPULAN

Penggunaan media air rendaman kedelai dengan pH 9,8 untuk produksi protease dari *Bacillus circulans* memberikan aktivitas protease yang tinggi sebesar 0,1814 U/ml.

Produksi protease pada media tersebut optimum pada jam ke-56, kondisi ini bertepatan dengan akhir fase logaritmik dari fase pertumbuhan mikroba.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bakhtiar, A., (1991), *Usaha Produksi Enzim Protease Dari Bacillus Subtilis ATCC 6633 Menggunakan media Produksi Limbah Tetes*, Laporan Penelitian, Universitas Airlangga, Surabaya.
2. Bergmeyer, H.V. dan Grassl, (1983), *Method of Enzymatic Analysis 2*. Verlag Chemia, Weinheim.
3. Bernlohr, R.W., (1964), *Postlogarithmic phase metabolism of sporulating microorganism protease of Bacillus licheniformis*. Biol. Chem. 239 : 538.
4. Bradford, M.M., (1976), *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding*. Anal. Biochem. 72; 248-254
5. Foisy, H., (1978), *Some Properties of Aminopeptidase from Brevibacterium linens* F.E.M.S. Microbiology Letters 3 : 207 – 210.
6. Kumalaningsih, S., (1989), *Isolasi dan pemurnian Enzim Proteolitik dari bakteri halofilik moderat*. Jawa Pos, Surabaya.
7. Novo, (1981), *Novo's Handbook of Practical biotechnology*, Novo, Denmark,
8. Schaefer, (1969), *Sporulation and the production of antibiotics, exoenzyme, and exotoxins*. Bacteriol. Rev. 33: 48-71.
9. Suhartono, M.T., (1988), *Enzim dan bioteknologi*, Pusat Antar Universitas, IPB, Bogor.
10. Suhartono, M.T., (1993), *Telaah formulasi aditif di dalam peningkatan daya simpan protease Bacillus sp.*, Laporan Penelitian Fateta, IPB.
11. Ward, O.P., (1983), *Properties of microbial peroteinase*. Di dalam W. Fogarty (ed). Microbial Enzymes and Biotechnology. Applied Science Publishing, London.